地塞米松降解新基因的探讨

张进[1]，斯丹[1]，杨致邦[1]，熊玉霞[1]，马廉举[2]，李津阳[3]，蒋仁举[1]*

1. 重庆医科大学基础医学院病原生物学教研室 重庆 400016；

2. 重庆医科大学药学实验教学中心 重庆 400016；

3. 重庆医科大学临床医学 2016 级；

摘要 目的 探讨地塞米松降解代谢新基因，为构建高效、稳定的地塞米松降解基因工程菌提供思路。**方法** 根据新发现的地塞米松降解菌 *Burkholderia sp.CQ001*（B.CQ001）全基因组测序和生物信息学分析，筛选疑似与地塞米松代谢相关基因。提取 *B.CQ001* 总 RNA 逆转录为 cDNA，以 cDNA 为模板，利用 PCR 技术快速克隆经实时荧光定量 PCR 技术（RT-qPCR）验证筛选出的新基因，测序鉴定后连接原核表达载体 pET-28a-c(+)，构建重组质粒 pET-28a-Ivd。将 pET-28a-Ivd 转化感受态 *Burkholderia sp.CQ001*，高效液相色谱（HPLC）验证表达菌降解能力的提升。**结果** 从 *B.CQ001* 基因组中筛选出 3 个未知基因分别为：ORF05499，ORF05827，ORF06535，其表达产物分别为：过氧化物还原酶，甾酮异构酶，异戊酰辅酶 A 脱氢酶；实时荧光定量 PCR 分析显示，3 个目的基因在地塞米松诱导后均有不同程度表达上调，基因 ORF06535 表达上调明显；在 *B.CQ001* 中过表达基因 ORF06535，HPLC 检测显示，表达菌对地塞米松磷酸钠和地塞米松的降解率可达到 89.0%和 80.0%，相比原菌 *B.CQ001* 有明显提升。**结论** 在 *B.CQ001* 中发现新的地塞米松降解相关基因 ORF06535，并完成基因克隆和功能验证，为制备地塞米松以及甾体激素污染的生物修复剂提供了新的基因信息。

关键词：伯克霍尔德菌；地塞米松；降解；基因；RT-qPCR

张进，斯丹为共同第一作者，通讯作者：蒋仁举

张进：邮箱：yinghangz@126.com　15310095725

蒋仁举：邮箱：743322835@qq.com　13883970998

收稿日期：**2017-09-02**

经费来源：**重庆市渝中区科委科技计划（20160110）**

通讯作者，电子邮箱：**蒋仁举** 743322835@qq.com

Study on New Genes associated with Dexamethasone Degradation

ZHANG Jin[1]，SI Dan[1]，YANG Zhi-bang[1]，XIONG Yu-xia[1]，MA Lian-ju[2]，LI Jin-yang[3]，JIANG Ren-ju[1]*

([1]Department of Pathogenic Biology，[2]Center of Pharmacy Experimental Teaching，[3]Clinical Medical College，Chongqing Medical University，Chongqing，400016，China)

Abstract **Objective** To investigate the new genes associated with dexamethasone metabolism in order to provide an idea for the construction of an efficient and stable dexamethasone degrading engineering bacterium. **Methods** Target genes which were suspectly associated with dexamethasone metabolism were screened according to the results of the whole genome sequencing and bioinformatics analysis of the newly discovered dexamethasone degrading bacteria Burkholderia sp.CQ001 (B.CQ001). Total RNA of *B.CQ001* was extracted from *B.CQ001* was processed by RT-PCR to produce cDNA. Using cDNA as a template, the new gene was rapidly cloned subsequently by PCR technology which was verified by real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR), then connected with prokaryotic expression vector pET-28a-c (+), after DNA sequencing. The recombinant plasmid pET-28a-Ivd was transformed into Burkholderia sp.CQ001. Using high performance liquid chromatography (HPLC) to evaluate the biodegradability of the expressed bacteria for dexmethasone sodium phosphate. **Results** Three unknown genes were screened out from *B.CQ001*: ORF05499, ORF05827, ORF06535, and their expressed products were: peroxiredoxin, Ketosteroid isomerase, isovaleryl coenzyme A dehydrogenase; Real time quantitative PCR analysis showed that the expression levels of three genes were upregulated in different degrees after induced by dexamethasone ,especially gene ORF06535; HPLC showed that the degradation of dexamethasone sodium phosphate and dexamethasone rate can reach to 89% and 80% after overexpression of ORF06535 in *B.CQ001*. Compared with the original strain *B.CQ001*, the degradation ability had improved significantly. **Conclusion** New gene ORF06535 associated with dexamethasone degradation was discovered in *B.CQ001* which had been cloned and functional verified. It provides new genetic information for preparation of dexamethasone and steroid hormone bioremediation.

Keywords: Burkholderia；Dexamethasone；Degradation；Gene；RT-qPCR

伯克霍尔德菌属（*Burkholderia*）的细菌因其16SrRNA基因序列，DNA/DNA同源性、细胞类脂和脂肪的特性于1992年从假单胞菌属的Palleroni rRNA同源群中划分出来成为独立的属[1]。该菌属的细菌广泛存在于自然环境中。近年来文献报道，伯克霍尔德菌具有非常独特的代谢能力，能以200多种有机物作为碳源、氮源和能源进行生长繁殖[2]，在环境保护研究中受到了越来越多研究者的青睐，被应用于生物修复技术中降解难以处理的外源性污染物，被冠以“环保卫士”的称号。其中，典型的代表菌株如*B.vietnamiensis strain G4*，它能降解地表水及地下水中具有生物毒性和致癌性的三氯乙烯（TCE），其全基因组信息已经公布[3]，但尚未见该菌属的细菌能够降解甾体类激素的报道。

地塞米松类药物是国内外广泛应用的甾体激素[4]，常用于临床各科多种疾病的治疗，如自身免疫性疾病[5]，皮肤病[6]，炎症[7]，哮喘[8]等。常用的地塞米松制剂为易溶于水的地塞米松磷酸钠。地塞米松类药物在应用过程中，其药物残液可经各种途径污染环境，特别是医院废水。国内外多篇文献报道在废水厂处理后的废水和江、河水中存在地塞米松等糖皮质类激素污染[9-12]。动物实验证实，地塞米松可引起兔的胎儿发育迟缓和上颚腭裂[13]，使斑马鱼头部骨骼产生骨质疏松[14]。给BALB/c小鼠饲喂含高、中、低污染量地塞米松磷酸钠的饮用水，对小鼠神经系统均有明显的影响，可抑制肠道益生菌的定植，有利于肠道致病菌的入侵[15]。环境中的激素可通过食物链的传递和生物蓄积作用对生物和人类健康造成严重影响。因此清除地塞米松类药物的医源性污染对保护生态环境具有重要的实际意义。

本研究在前期工作中，从医院废水中分离到一株伯克霍尔德氏菌属的细菌*Burkholderia sp.CQ001*，并首次发现该菌具有降解地塞米松的功能。通过对其全基因组测序，成功构建该菌基因组文库。为深入了解地塞米松降解相关基因及其降解机制，通过生物信息学分析，从该菌的未知基因中筛选出疑似与地塞米松降解相关基因，通过RT-qPCR和克隆表达验证，为深入了解地塞米松降解相关基因及其降解机制，构建高效降解工程菌，制备清除环境中地塞米松类药物污染的生物净化剂提供基因信息。

1 材料

1.1 菌株

伯克霍尔德菌 CQ001（*Burkholderia sp.CQ001*）：从中国重庆市某医院净化处理前的污水处理池废水中分离，16SrDNA 测序鉴定，命名为 *Burkholderia sp.CQ001*（B.CQ001）。该菌经驯化后对地塞米松磷酸钠及地塞米松的总降解率分别为 84.8%和 77.11%。目前该菌全基因组测序已完成，BioProject Accession：PRJNA329146[16]。实验用大肠杆菌菌株 *Escherichia coli DH5α*由本实验室保藏。

1.2 主要培养基

LB 固体培养基为重庆泽恒生物售品；缺碳培养液（1000mL）：K_2HPO_4 1.6g，KH_2PO_4 0.4g，$MgSO_4·7H_2O$ 0.2g，NaCl 0.1g，$(NH_4)_2SO_4$ 0.5g，为本实验室配制；地塞米松磷酸钠原液（5mg/mL）：200mL 无菌 ddH_2O 充分溶解 1.0g 地塞米松磷酸钠后 4℃避光储存备用；地塞米松磷酸钠培养液（500ng/mL）：9mL 缺碳培养液中加入 1mL 5mg/mL 地塞米松磷酸钠原液，于使用前配制；蔗糖无机盐液体培养基（1000mL）：缺碳培养液 1000mL 加入蔗糖 3.0g，于使用前配制。

1.3 其它主要的实验材料

RNAprep Pure 培养细胞/细菌总 RNA 提取试剂盒（天根，北京）；PrimeScript^{TM}RT reagent Kit with gDNA Eraser（TaKaRa，大连）；pUCm-T Vector Cloning Kit（生工，上海）；pET-28a(+)表达载体为重庆医科大学附属第一医院脂糖代谢实验室惠赠；质粒 DNA 提取试剂盒（OMEGA，美国）；MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit（TaKaRa，大连）；限制性核酸内切酶 NotI、BamHI（NEB，美国）；其它试剂均为进口或国产分析纯。

2 方法

2.1 地塞米松降解相关基因的挖掘

根据 ***B.CQ001*** 基因组测序结果，BioProject Accession：PRJNA329146，BioSample: SAMN05417702，ID: 5417702。针对该菌基因组中 429 个未被分类的基因，利用 NCBI BLASTX 2.6.1 预测其表达蛋白与功能。选取：与表达甾体代谢相关类酶同源性较高；与目前文献报道的甾体降解相关基因距离较近的基因（基因测序 ORF 编号距离＜20，且基因序列长度＞100bp）。

2.2 目的基因的生物信息学分析

将筛选的目的基因序列采用 DNAMAN 和 NCBI（National Center for Biotechnology Information，http：//www.ncbi.nlm.nih.gov/）网站上 Blast N 和 Blast X 进行翻译产物预测。利用蛋白质分析系统 EXPASY Proteomic（http://www.expasy.org/proteomics）中的蛋白质在线分析软件 Protparam（http://web.expasy.org/protparam/）结合 Compute PI/Mw 对 3 个未知基因编码氨基酸序列进行基本理化性质分析；利用 ProtScale（http://web.expasy.org/protscale/）进行预测蛋白亲/疏水性分析；利用 SOSUI（http://harrier.nagahama-i-bio.ac.jp/sosui/sosui_submit.html）进行预测蛋白可溶性分析；利用 PSORTb 3.0.2（http://www.psort.org/psortb/）进行亚细胞定位分析；利用 TMHMM server v2.0（http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/）进行跨膜结构分析；利用 SignalP 4.1 Server（http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/）进行信号肽分析；利用 NCBI 的 Conserved Domains（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/?term=）进行保守结构域和功能域分析；利用在线工具 SOPMA（https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html）进行二级结构预测；利用 SWISS-MODEL（http：//swissmodel.expasy.org/）进行同源三维建模。

2.3 RT-qPCR 验证目的基因

实验分为诱导组和对照组。诱导组将 *B.CQ001* 接种于地塞米松磷酸钠培养液，对照组接种于蔗糖无机盐培养液，置 37℃，200r/min 震荡培养，按照 RNAprep Pure 培养细胞/细菌总 RNA 提取试剂盒说明提取总 RNA。以约 500ng 总 RNA 作为模板，逆转录合成 cDNA[17]。以 rpoA 为内参，cDNA 为模板，验证 *B.CQ001* 在两种不同培养环境下前期筛选出的 3 个未知基因在转录水平上的表达变化。基因 qPCR 引物见表 1。反应体系（10uL）：SYBR Premix 5.0uL、上下游引物（10 umol/L）各 0.4uL、cDNA 溶液 1.0uL、无酶 ddH_2O 3.2uL。反应条件：95℃预变性 30s；95℃变性 5s，60℃退火及延伸 30s，共 40 个循环；熔解曲线阶段：65℃到 95℃。根据 RT-qPCR 反应后得到的各样本 Ct 值，采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法（$\Delta Ct=Ct_{目的基因}-Ct_{rpoA}$，$\Delta\Delta Ct=Ct_{诱导组}-Ct_{对照组}$）进行计算。

表 1 *Burkholderia sp. CQ001* 3 个未知基因实时荧光定量 PCR 引物

Table1 Real-time PCR primers of three unknown genes from *Burkholderia sp. CQ001*

引物名称 Primer		序列 Primer sequences
rpoA	Forward	5' - GATCTGAACGTCGAGCTTGC - 3'
	Reverse	5' - AAGGAAGGTGAAGGCGTTGT - 3'
ORF05499	Forward	5' - ACATGGTGCAGAACGAAGC - 3'
	Reverse	5' - AGTACGCAATACGCATCGAA - 3'
ORF05827	Forward	5' - CGCAGGATTTTTCATTGACG - 3'
	Reverse	5' - GATCCGGTTGACCACCATC - 3'
ORF06535	Forward	5' - CAATTCATGCTCGGTGAAGA - 3'
	Reverse	5' - CAGATCCATCGGAAACTGGT - 3'

2.4 PCR 扩增 ORF06535 基因

选择实时荧光定量 PCR 验证经地塞米松诱导后表达升高明显的 ORF06535 基因，用 Primer Premier 6.0 和 DNAstar 设计扩增引物。上游引物序列为：5' - ATGATCAACCTGCCCGGT - 3'，下游引物序列为：5' - TTACATCGTTTCCGCGAAC - 3'，提交生工合成。以 *B.CQ001* cDNA 为模板，进行 PCR 扩增。反应体系：cDNA 2uL，上、下游引物（20umol/L）各 0.5uL，Taq mix 10uL，无菌 ddH_2O 7uL，总体积 20uL。反应程序：94℃预变性 3min，94℃变性 30s，52℃退火 30s，72℃延伸 1min，30 个循环后，72℃延伸 5min。取 5uL 扩增产物 1%琼脂糖凝胶电泳，电泳结果在凝胶成像仪下观察并拍照。

2.5 ORF06535 克隆

因基因 ORF06535 表达蛋白：异戊酰辅酶 A 脱氢酶，故后简称该基因为：Ivd。按照 TaKaRa 胶回收试剂盒说明回收基因 ORF06535 PCR 产物并纯化，连接 pUCm-T 载体，热激转化大肠杆菌 DH5α感受态，37℃ 120rpm/min 复苏培养 1h。取 50uL 接种于含 IPTG、X-Gal 和 Amp（100ug/mL）的 LB 平板，37℃培养过夜后筛选阳性克隆。经质粒 PCR 和双酶切初步鉴定后送生工测序。经鉴定阳性重组质粒命名为 pUCm-Ivd。

2.6 重组质粒 pET-28a-Ivd 构建

将克隆质粒 pUCm-Ivd 与表达载体 pET-28a-c(+)分别用 BamHI 和 NotI 双酶切后，切胶回收酶切片段，加入 T4 DNA 连接酶 16℃连接过夜。连接产物转化氯化钙法制备的感受态细胞 *B.CQ001*，取 200uL 接种于含 Kana（50ug/mL）的 LB 平板，37℃培养过夜后筛选阳性克隆表达菌，经质粒 PCR 和双酶切初步鉴定，送生工测序。经鉴定阳性重组质粒命名为 pET-28a-Ivd。

2.7 目的基因表达验证

转化有 pET-28a-Ivd 的阳性克隆表达菌命名为：*B.CQ002*，将表达菌与驯化冻存菌 *B.CQ001*，参照石中全等[18]的方法，挑取单菌落接种于 10mL 500ug/mL 的地塞米松磷酸钠培养液，置 37℃，200r/min 震荡培养 10 天，于培养的不同时间点（0h，2h，4h，8h，12h，24h，48h，72h，96h，120h，144h，168h，192h，240h）用高效液相色谱法（HPLC）检测表达菌和驯化冻存菌对地塞米松磷酸钠及地塞米松的降解能力和降解高峰时间。

2.8 统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件对实验数据进行统计分析。采用配对 t 检验分析 3 个目的基因地塞米松诱导组和蔗糖无机盐对照组在转录水平上的表达变化和 *B.CQ001* 和 *B.CQ002* 对地塞米松磷酸钠及地塞米松的降解作用差异。

3 结果

3.1 地塞米松降解相关基因的挖掘

从 *B.CQ001* 众多未知基因中筛选出 3 个基因，分别为：ORF05499，ORF05827，ORF06535，均来自该菌集中了大部分代谢功能基因的 2 号染色体。3 个目的基因的长度和选择依据见表 2，基因簇排列情况见图 1，基因位置见图 2。目的基因 ORF05499 与文献报道的甾体代谢基因 3β-羟基甾体脱氢酶/异构酶（3β-HSD）距离较近（基因测序 ORF 编号距离=10），且与课题组前期验证的地塞米松摄取转运基因 ABC 转运子距离接近（基因测序 ORF 编号距离=11）；目的基因 ORF05827 经 NCBI BLASTX 2.6.1 预测表达蛋白为甾酮异构酶；目的基因 ORF06535 表达氨基酸序列与课题组前期从一株产碱假单胞菌中分离到的具有地塞米松降解活性的 41kD 蛋白经质谱鉴定得到的 5 条肽段序列相似性较高（Query cover：33%，Ident：54%）[19]（图 3）。

表 2 待验证的 *Burkholderia sp. CQ001* 3 个未知基因

Table2 Three unknown genes to be validated from *Burkholderia sp. CQ001*

目的基因	基因位置	序列长度（bp）	选择依据
ORF05499	2 号染色体	468bp	与甾体代谢基因 3β-HSD，ABC 转运子距离接近
ORF05827	2 号染色体	474bp	表达甾体代谢相关类酶：甾酮异构酶
ORF06535	2 号染色体	1182bp	课题组前期发现地塞米松降解相关蛋白 41kD

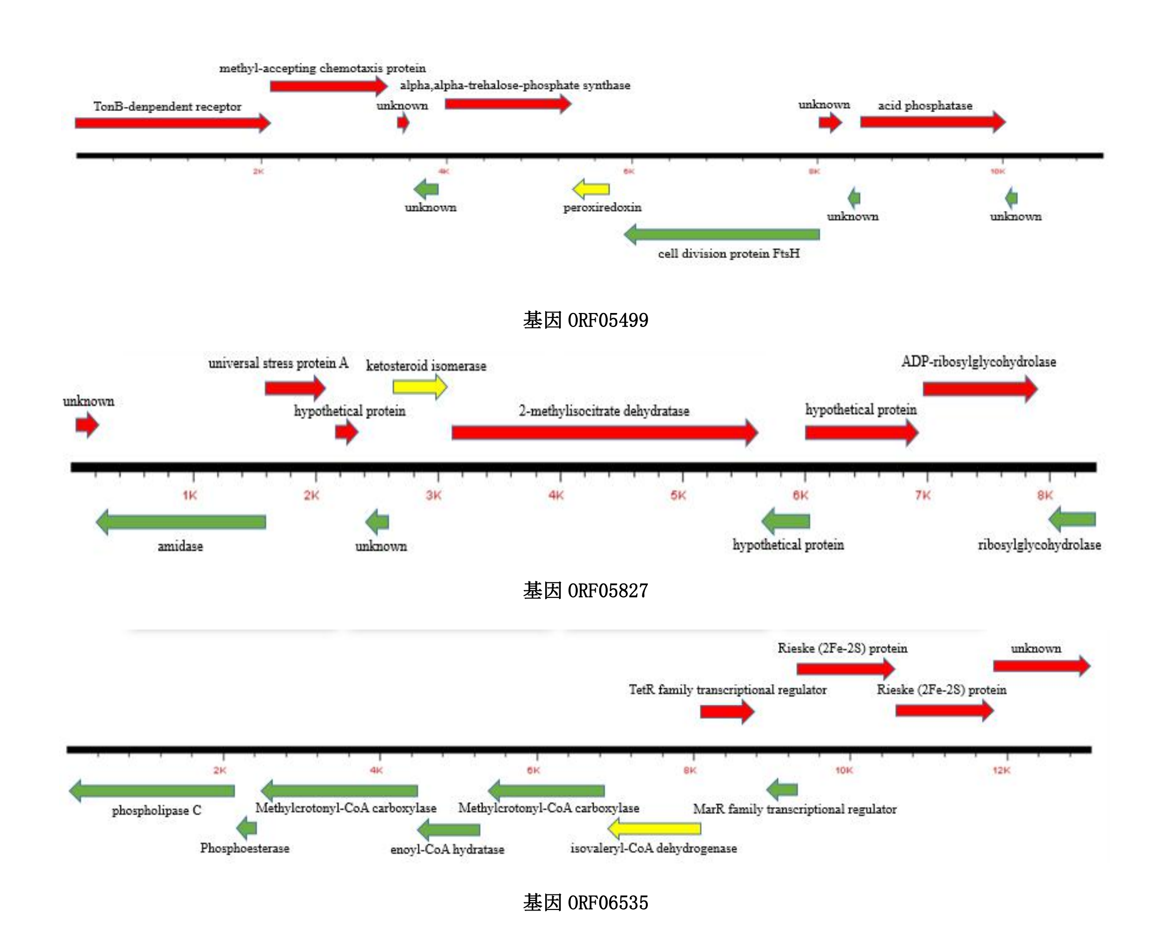


图 1 待验证的 *Burkholderia sp. CQ001* 3 个未知基因基因簇排列情况

Fig.1 The arrangement of 3 unknown gene clusters in *Burkholderia sp. CQ001* to be verified

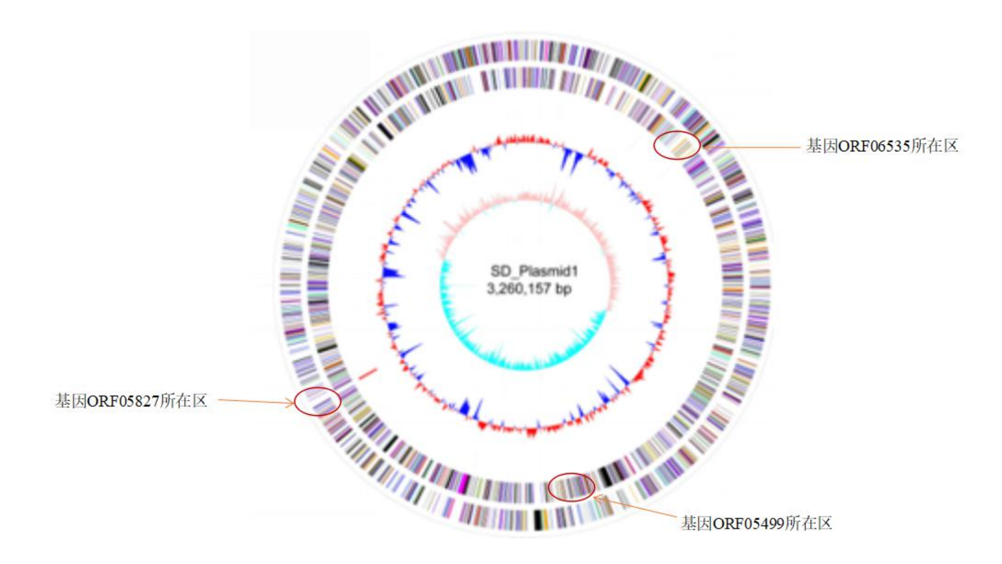


图 2 待验证的 *Burkholderia sp. CQ001* 3 个未知基因基因位置图

Fig. 2 The location map of 3 unknown genes in *Burkholderia sp. CQ001*

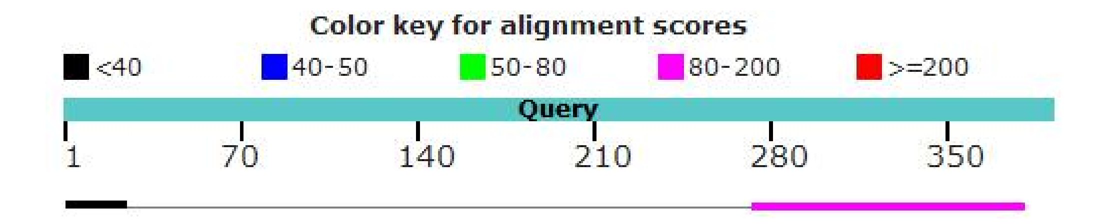


图 3 目的基因 ORF06535 氨基酸序列与降解相关蛋白 41kD 5 条肽段氨基酸序列比对结果

Fig. 3 The sequence alignment result of ORF06535 amino acid sequence and 5 peptides from 41kD degradation protein

3.2 目的基因生物信息学分析

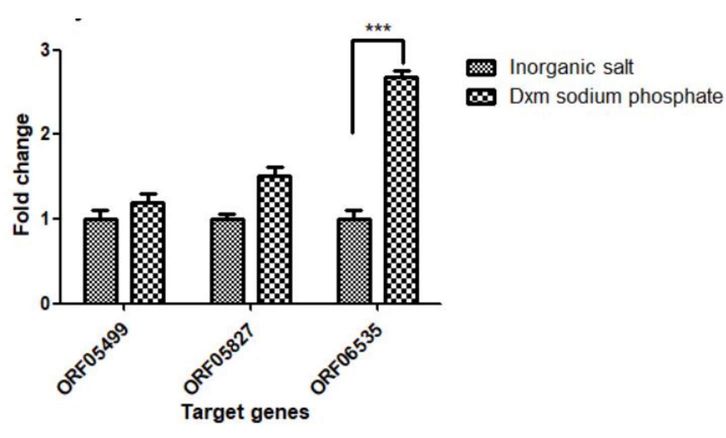
表 3 待验证的 *Burkholderia sp.CQ001* 3 个未知基因生物信息学分析结果

Table3 Bioinformatics analysis results of 3 unknown genes from *Burkholderia sp.CQ001*

基因名称	ORF05499	ORF05827	ORF06535
基因长度(bp)	468bp	474bp	1182bp
理化性质			
氨基酸数	155	157	393
分子式	$C_{722}H_{1148}N_{198}O_{222}S_8$	$C_{817}H_{1260}N_{250}O_{224}S_6$	$C_{1887}H_{2996}N_{524}O_{569}S_{24}$
相对分子质量(Mr)	16410	18360	42897
理论等电点(pI)	4.57	9.98	5.71
不稳定系数	26.17（稳定）	24.47（稳定）	30.23（稳定）
亲/疏水性(GRAVY)	0.270（疏水）	-0.466（亲水）	-0.126（亲水）
预测蛋白	过氧化物还原酶	甾酮异构酶	异戊酰辅酶 A 脱氢酶
可溶性	可溶蛋白	可溶蛋白	可溶蛋白
亚细胞定位	未知	未知	细胞质
跨膜区	无跨膜（膜内）	无跨膜（膜内）	无跨膜（膜内）
信号肽	无	无	无
保守结构域	OsmC 结构域 氧化应激调节	Snoal-like 结构域 甾酮分子异构化	Acyl-CoA.dh.N 物质分解代谢
二级结构	α-螺旋(40.65%) β-折叠(10.97%) 延伸链(25.16%) 无规则卷曲(23.23%)	α-螺旋(63.69%) β-折叠(4.46%) 延伸链(12.74%) 无规则卷曲(19.11%)	α-螺旋(40.20%) β-折叠(13.23%) 延伸链(22.65%) 无规则卷曲(23.92%)
三维建模			

3.3 地塞米松对目的基因表达的影响

为了探究 3 个未知基因在地塞米松降解过程中起到的作用，通过 RT-qPCR 检测 3 个目的基因地塞米松诱导后的表达情况。结果显示，3 个基因在以地塞米松为唯一碳源和能源的诱导条件下表达均有上调，和蔗糖无机盐对照组相比差异具有统计学意义（$P < 0.05$）。其中，诱导组 ORF06535 表达水平显著高于对照组，提示 ORF06535 可能是 *B.CQ001* 代谢地塞米松机制中的一个关键基因，对于地塞米松降解具有特殊作用（图 4）。



对照组 - 蔗糖无机盐培养组

诱导组 - 地塞米松磷酸钠培养组

Control group - Sucrose inorganic salt culture group

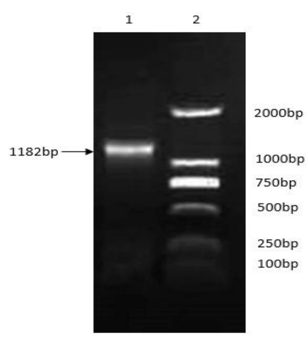
Induction group - Dexamethasone sodium phosphate culture group

图 4 RT-qPCR 技术验证地塞米松诱导组和蔗糖无机盐对照组 3 个基因差异表达

Fig.4 Different expression levels of 3 genes between dexamethasone induced group and sucrose inorganic salt control group

3.4 PCR 扩增 ORF06535 基因

PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳分析，可见在 1100bp 左右有一条带，大小与预期一致，见图 5。提交上海生工测序。测序结果显示，基因序列与基因 ORF06535 序列一致。



1：基因 ORF06535

2 : DNA marker DL2000

1 : Gene ORF06535

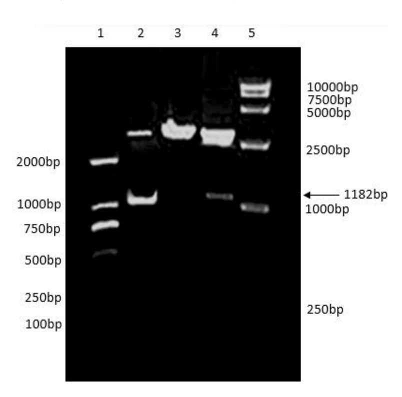
2 : DNA marker DL2000

图 5 基因 ORF06535 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳结果

Fig.5 Agarose gel electrophoresis result of gene ORF06535 PCR products

3.5 目的基因 ORF06535 克隆

重组质粒 pUCm-Ivd 转化 *E.Coli* DH5α后，经 PCR 和双酶切鉴定确有插入片段，见图 6。测序结果显示，插入的基因片段全长 1182bp，与预期一致。



1 : DNA marker DL2000

2 : pUCm-Ivd PCR 验证

3 : pUCm-Ivd

4 : pUCm-Ivd/BamHI+NotI 双酶切验证

5 : DNA marker DL15000

1: DNA Marker DL2000

2 : PCR validation of pUCm-Ivd

3 : pUCm-Ivd

4 : Double enzyme digestion assay of pUCm-Ivd/BamHI+NotI

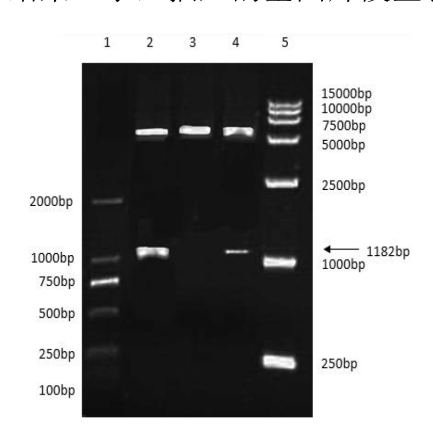
5 : DNA marker DL15000

图 6 pUCm-Ivd 琼脂糖凝胶电泳结果

Fig.6 Agarose gel electrophoresis result of pUCm-Ivd

3.6 重组质粒 pET-28a-Ivd 构建

重组质粒 pET-28a-Ivd 转化感受态 *B.CQ001* 后，经 PCR 及双酶切鉴定确有插入片段，见图 7。测序结果显示，插入的基因片段全长 1182bp，与预期一致。



1 : DNA marker DL2000

2 : pET-28a-Ivd PCR 验证

3 : pET-28a-Ivd 重组质粒

4 : pET-28a-Ivd/BamHI+NotI 双酶切验证

5 : DNA marker DL15000

1 : DNA Marker DL2000

2 : PCR validation of pET-28a-Ivd

3 : pET-28a-Ivd

4 : Double enzyme digestion assay of pET-28a-Ivd/BamHI+NotI

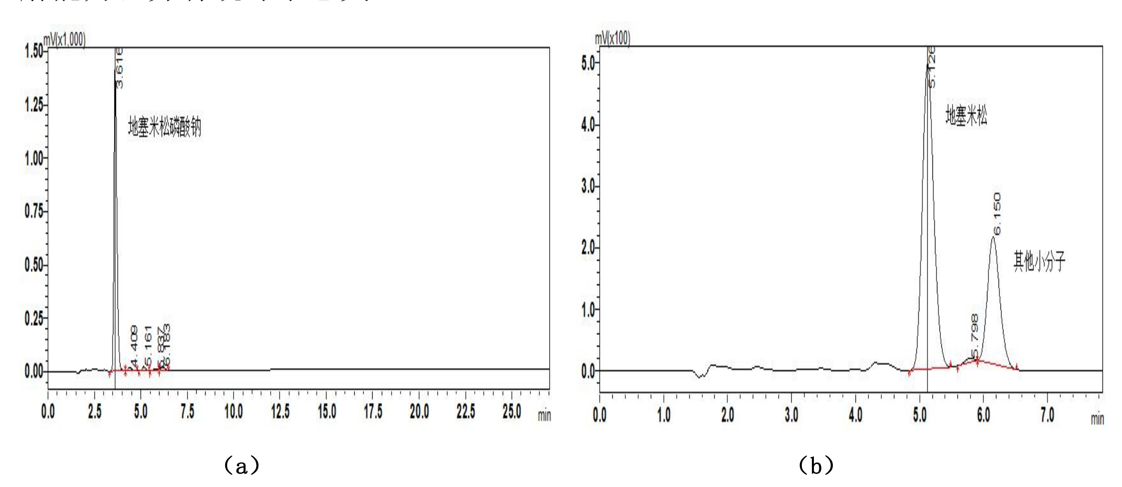
5 : DNA marker DL15000

图 7 pET-28a-Ivd 琼脂糖凝胶电泳结果

Fig.7 Agarose gel electrophoresis result of pET-28a-Ivd

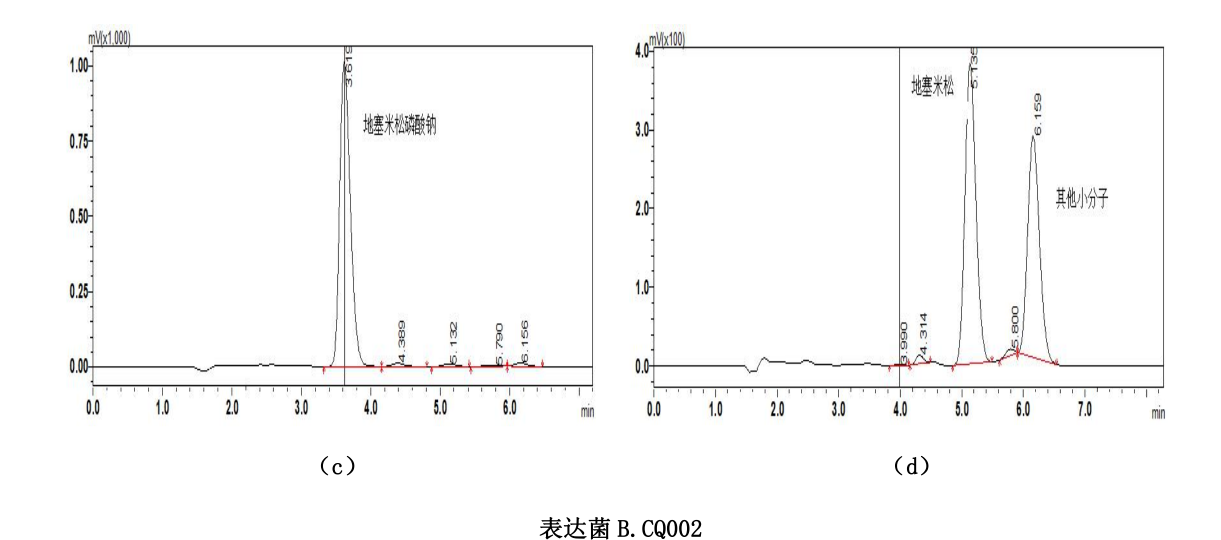
3.7 目的基因表达验证

HPLC 结果显示，驯化冻存菌 *B.CQ001* 和表达菌 *B.CQ002* 均能将地塞米松磷酸钠先降解为地塞米松再降解为其他小分子物质（图 8）。相比驯化冻存菌 *B.CQ001*，表达菌 *B.CQ002* 降解高峰出现的时间无明显改变，但对地塞米松磷酸钠的 10 天累计总降解率从 *B.CQ001* 的 80.5%升高到 89.0%（图 9-a）；对地塞米松的 10 天累计总降解率从 *B.CQ001* 的 71.5%升高到 80.0%（图 9-b）。SPSS 统计分析驯化冻存菌 *B.CQ001* 和表达菌 *B.CQ002* 对地塞米松磷酸钠及地塞米松的降解能力差异有统计学意义。（$P < 0.05$）



（a）　　　　　　　　　　　　（b）

驯化冻存菌 B.CQ001

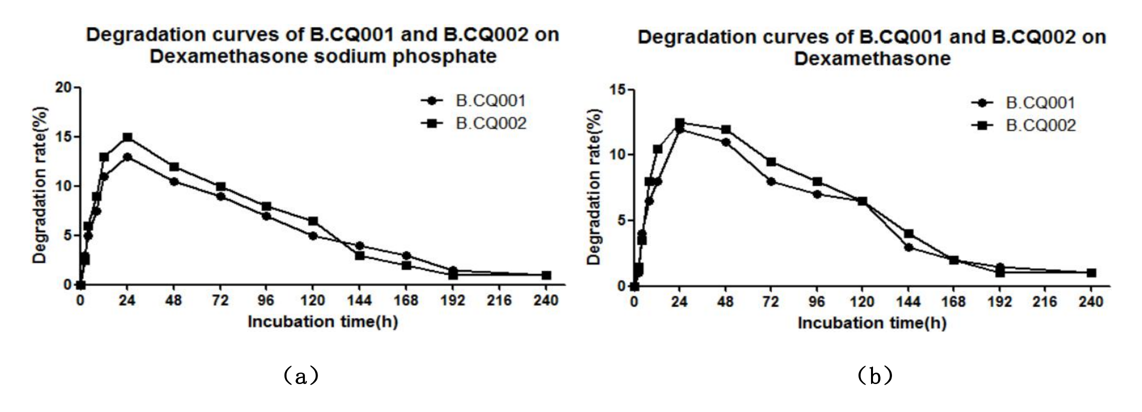


(c) (d)

表达菌 B.CQ002

图 8 驯化冻存菌 *B.CQ001* 和表达菌 *B.CQ002* 降解过程 HPLC 色谱图

Fig.8 Degradation process HPLC chromatogram map of *B.CQ001* and *B.CQ002*



(a) (b)

图 9 *B.CQ001* 和 *B.CQ002* 地塞米松磷酸钠和地塞米松的降解曲线

Fig.9 Degradation curves of *B.CQ001* and *B.CQ002* dexamethasone sodium phosphate and dexamethasone

4 讨论

文献报道，甾体激素的降解非单一路径，而是形成网络，涉及分泌蛋白与非分泌蛋白共同参与[20]。目前，一些关键基因的功能已被鉴定，德国基尔大学的熊光明教授等[21]报道发现睾丸酮丛毛单胞菌（*Comamonas testosteroni*，*C.T.*）中存在 3a-羟基类固醇脱氢酶/羰基还原酶（3a-HSD/CR）基因活性。3a-羟基类固醇脱氢酶/羰基还原酶是一个降解环境中甾体类化合物的关键酶。另有美国学者 Julio E.Cabrera[22]报道了 3，17β-羟基类固醇脱氢酶基因，其编码的 3，17β-HSD 能够降解类固醇激素。Pandey 等[23]发现 Mce4 操纵子编码的转运蛋白可作用于甾体,是 *M tuberculosis* 摄取宿主胆固醇的关键系统。

本课题前期从 *B.CQ001* 全基因组测序中发现有一条已报道的涉及甾体的代谢途径，含有已报道的 1 个编码与甾类化合物代谢中摄取转运蛋白相关的基因和 9 个与甾类化合物代谢关键酶相关的基因[16]。本研究从该菌未知功能的基因中筛选出三个目的基因 ORF05499、ORF05827 以及 ORF06535，通过 RT-qPCR 技术验证，也与地塞米松降解有关。这也再次证实甾体激素降解是多基因联合作用的过程。3 个基因的预测蛋白分别为过氧化物还原酶、甾酮异构酶、异戊酰辅酶 A 脱氢酶，分别负责不同的代谢步骤共同完成地塞米松到小分子的物质代谢转变。其中，基因 ORF06535 表达上调最为明显，推测为该菌地塞米松降解途径中的一个关键基因，其表达产物异戊酰辅酶 A 脱氢酶，新近报道与脂质代谢相关[24]，在地塞米松降解过程中的具体作用有待进一步探讨。但 3 个基因均未见涉及甾类化合物代谢及地塞米松代谢的报道，本研究结果扩展了对甾类化合物代谢相关基因的认识，也为进一步构建环境污染地塞米松高效降解菌提供了信息。

B.CQ001 驯化后对地塞米松磷酸钠及地塞米松的总降解率可明显提升，但在后期冻存恢复培养过程中也发现其降解能力略有下降，呈现不稳定性。通过质粒转化过表达地塞米松降解关键基因，构建表达菌 *B.CQ002*，HPLC 检测显示，表达菌对地塞米松磷酸钠及地塞米松的总降解率可达到 89.0%和 80.0%，其降解能力有一定程度的提升，此结果为后期构建高效、稳定的地塞米松降解工程菌提供了初步实践。

参考文献

[1] Yabuuchi E, Kosako Y, Oyaizu H, et al. Proposal of Burkholderia gen. nov. and transfer of seven species of the genus Pseudomonas homology group II to the new genus, with the type species Burkholderia cepacia (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov[J]. Microbiology and immunology, 1992, 36(12): 1251-1275.

[2] Lemaire B, Chimphango S B M, Stirton C, et al. Biogeographical patterns of legume-nodulating Burkholderia spp.: From African fynbos to continental scales[J]. Applied and environmental microbiology, 2016, 82(17): 5099-5115.

[3] Hamid S, Bae W, Kim S, et al. Enhancing co-metabolic degradation of trichloroethylene with toluene using Burkholderia vietnamiensis G4 encapsulated in polyethylene glycol polymer[J]. Environmental technology, 2014, 35(12): 1470-1477.

[4] 赵奎. 地塞米松磷酸钠注射液在急诊应用的处方分析[J]. 中国医院用药评价与分析, 2011, 11(5): 475-476.

Zhao K. Prescription analysis of Dexamethasone Sodium Phosphate Injection in emergency department [J]. Chinese hospital drug evaluation and analysis, 2011, 11 (5): 475-476.

[5] Takahashi T, Nakamura Y, Tsuya A, et al. Pharmacokinetics of aprepitant and dexamethasone after administration of chemotherapeutic agents and effects of plasma substance P concentration on chemotherapy-induced nausea and vomiting in Japanese cancer patients[J]. Cancer chemotherapy and pharmacology, 2011, 68(3): 653-659.

[6] Rathod S S, Motghare V M, Deshmukh V S, et al. Prescribing practices of topical corticosteroids in the outpatient dermatology department of a rural tertiary care teaching hospital[J]. Indian journal of dermatology, 2013, 58(5): 342.

[7] Kim E J, Lee JG, Kim JY, Kim JY, et al. Enhanced immune-modulatory effects of thalidomide and dexamethasone co-treatment on T cell subsets. [J]. Immunology, 2017. DOI: 10.1111/imm.12804.

[8] Mushaben E M, Brandt E B, Hershey G K, et al. Differential effects of rapamycin and dexamethasone in mouse models of established allergic asthma[J]. Plos One, 2013, 8(1):e54426.

[9] Vander Linden SC, Heringa MB, Man HY, et al. Detection of multiple hormonal activities in wastewater effluents and surface water, using a panel of steroid receptor CALUX bioassays. [J]Environ Sci Technol. 2008,42(15):5814-20

[10] Schriks M, van Leerdam JA, van der Linden SC, et al. High-resolution mass spectrometric identification and quantification of glucocorticoid compounds in various wastewaters in the Netherlands[J].Environ Sci Technol. 2010,44(12):4766-74.

[11] Chang H, Hu J, Shao B.Occurrence of natural and synthetic glucocorticoids in sewage treatment plants and receiving river waters[J].Environ Sci Technol. 2007,41(10):3462-8.

[12] 石中全,周裕珍,杨致邦等. 废水中地塞米松污染的探讨[J]，中国医药指南。2012，10（9）：319-321。

Shi Z Q, Zhou Y Z, Yang Z B, et al. Investigation on the pollution of dexamethasone in wastewater. [J], Chinese Medical Guideline.2012,10 (9):319-321.

[13] Takahashi T, Nakamura Y,Tsuya A, et al. Pharmacokinetics of aprepitant and dexamethasone after administration of chemotherapeutic agents and effects of plasma substance P concentration on chemotherapy-induced nausea and vomiting in Japanese cancer patients[J].Cancer Chemother Pharmacol, 2011,(68):653–659.

[14] 韦英杰, 王长梅, 蔡雪婷等. 地塞米松影响骨骼发育的斑马鱼模型的建立[J]. 药学学报, 2013, 48(2): 255-260.

Wei Y J, Wang C M, Cai X T, et al. Establishment of zebrafish model of skeletal development affected by dexamethasone [J]. Journal of pharmacology, 2013, 48 (2): 255-260.

[15] 杨茜, 李晓愚, 斯丹等. 饮水中地塞米松污染对小鼠肠道菌群的影响[J]. 南方医科大学学报, 2016, 36(2): 238-243.

Yang Q, Li X Y, S D, et al. Effects of dexamethasone pollution in drinking water on intestinal microflora in mice [J]. Journal of Southern Medical University, 2016, 36 (2): 238-243.

[16] 斯丹, 杨致邦, 蒋任举等. 具有高效降解地塞米松能力的伯克霍尔德菌CQ001株的分离及功能基因组学分析[J]. 第三军医大学学报, 2017, 39(13):1352-1359.

Si D, Yang Z B, Jiang R J, et al. Separation and functional genomics of *Burkholderia sp.CQ001* with high degradation ability of dexamethasone [J]. Journal of Third Military Medical University, 2017, 39 (13): 1352-1359.

[17] Bustin S A, Benes V, Garson J A, et al. The MIQE Guidelines: Minimum information for Publication of quantitative Real-Time PCR experiments[J]. Clinical Chemistry, 2009:611-612

[18] 石中全, 杨致邦, 朱黎黎,等. 一株地塞米松磷酸钠降解菌的分离鉴定[J]. 中国微生态学杂志, 2014, 26(11):1250-1256.

Shi Z Q, Yang Z B, Zhu L L, et al. Isolation and identification of a strain of dexamethasone sodium phosphate degradation bacteria [J]. Chinese Journal of microecology, 2014, 26 (11): 1250-1256.

[19] Zhu L, Yang Z, Qian Y, et al. Degradation of dexamethasone by acclimated strain of Pseudomonas Alcaligenes[J]. International Journal of Clinical & Experimental Medicine, 2015, 8(7):10971.

[20] Yao K, Wang F Q, Zhang H C, et al. Identification and engineering of cholesterol oxidases involved in the initial step of sterols catabolism in Mycobacterium neoaurum.[J]. Metabolic Engineering, 2013, 15(1):75-87.

[21] Xiong G, LuoY, Jin S,, et al. Cis- and trans-regulatory elements of 3alpha-hydroxysteroid dehydrogenase/carbonyl reductase as biosensor system for steroid determination in the environment[J]. Chemico-Biological Interactions, 2009, 178(3):215-220.

[22] Torchilin V P, Narula J, Halpern E, et al. Poly (ethylene glycol)-coated anti-cardiac myosin immunoliposomes: factors influencing targeted accumulation in the infarcted myocardium[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 1996, 1279(1): 75-83.

[23] Pandey A K, Sassetti C M. Mycobacterial persistence requires the utilization of host cholesterol[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008, 105(11): 4376-4380.

[24] Bloem A, Sanchez I, Dequin S, et al. Metabolic impact of redox cofactor perturbations on the formation of aroma compounds in Saccharomyces cerevisiae[J]. Applied and environmental microbiology, 2015: AEM. 02429-15.